

LIDIANA LOVATO

ESTUDOS MORFOLÓGICOS E ANÁLISES DE SEQÜÊNCIAS DO GENE
MITOCONDRIAL CITOCROMO OXIDASE I (COI) EM POPULAÇÕES DE *Atta*
cephalotes (L., 1758)

Curitiba
2006

LIDIANA LOVATO

ESTUDOS MORFOLÓGICOS E ANÁLISES DE SEQUÊNCIAS DO GENE
MITOCONDRIAL CITOCROMO OXIDASE I (COI) EM POPULAÇÕES DE *Atta*
cephalotes (L., 1758)

Tese apresentada à Coordenação do
Curso de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas, Área de concentração em
Entomologia, da Universidade Federal do
Paraná, como requisito parcial para a
obtenção do Título de Mestre em Ciências
Biológicas.

Curitiba
2006

LIDIANA LOVATO

“ESTUDOS MORFOLÓGICOS E ANÁLISES DE SEQÜÊNCIAS DO GENE
MITOCONDRIAL CITOCROMO OXIDASE I (COI) EM POPULAÇÕES DE *Atta*
cephalotes (L., 1758)”

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção do grau de “Mestre em Ciências Biológicas”, no Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração em Entomologia, da Universidade Federal do Paraná, pela comissão formada pelos professores:

Dr. Luiz Gonzaga Esteves Vieira (Orientador)
IAPAR – Londrina PR

Dr. Alfredo Otávio Rodrigues de Carvalho
IAPAR – Londrina PR

Profa. Dra. Danúncia Urban
UFPR

Curitiba, 10 de fevereiro de 2006.

Aos meus avós Bento
(*in memoriam*) e Palmira
por serem eles os maiores
culpados por eu ser hoje,
quem sou.

DEDICO

Aos meus pais Irineu e
Lidia por todo o amor, carinho,
compreensão e oportunidades
que me proporcionaram.

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Ao Cara lá de cima por estar presente em todos os momentos.

Ao Dr. Luiz Gonzaga Esteves Vieira (Santista) pela orientação e presença constante no desenvolvimento deste trabalho, período em que pude reconhecer sua competência e dedicação profissional bem como o respeito dedicado à sua equipe e orientados.

À Universidade Federal do Paraná - UFPR e Instituto Agrônomo do Paraná – IAPAR pela oportunidade de realização deste curso.

Aos Docentes do Departamento de Entomologia e Zoologia pelos conhecimentos repassados e contribuição para minha formação.

Aos colaboradores Dr. Jacques Hubert Charles Delabie, Dra. Rosaly Ale-Rocha, Dra. Joana D'Arc Ribeiro, Dra. Suzana Ketelhut, Dr. John Lattke, Dr. Klaus Jaffé, Dr. Manoel Solis, Dr. Jean Maes, Ms. Adriana Mendonça e respectivas instituições pelo apoio prestado na obtenção dos espécimes que possibilitaram a realização deste trabalho.

Aos pesquisadores Dr. Carlos R. Brandão do Museu de Zoologia da USP e Dr. Antonio José Mayhé-Nunes do Departamento de Biologia Animal da UFRRJ, pelo auxílio durante a visita e consultas a estas instituições.

Ao professor Dr. Amarildo Pasini e a Universidade Estadual de Londrina – UEL pelos ensinamentos passados durante a realização da disciplina Prática de Docência Zoologia/ Entomologia I.

Ao Dr. Alfredo O. R. de Carvalho por sua colaboração para com este trabalho.

À professora Danúncia Urban por todo carinho, amizade e dedicação durante todas as fases de desenvolvimento deste trabalho.

Ao colega Dalton R. dos Santos, um excelente profissional, por toda a ajuda e dedicação.

Aos colegas Dr. Marcelo Lopes da Silva e Dra. Regina Célia Zonta de Carvalho por toda a sua dedicação durante a primeira fase de desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr. Celso Luiz Hohmann pela amizade e interesse para com o desenvolvimento deste trabalho.

Aos atuais e antigos amigos do Laboratório de Biotecnologia, Lucélia, Sandra, Eliane, Cherri, Marília, Tiago Benedito, Thiago Falda, Jane, Ilara, Iris, Mônica, Bete, Diogo, Alessandra, Nelson, Lucia, Juliana e Humberto pela convivência, companheirismo, boas risadas e apoio, durante o período que convivemos. Especialmente ao Hugo por toda a paciência e ensinamentos durante os primeiros dias de trabalho no laboratório.

Ao mais que amigo Dr. Laurival Antônio Vilas-Boas (Lori), por ter caído como um anjo na realização deste trabalho, pelos ensinamentos, paciência e principalmente compreensão nos momentos de maior dificuldade.

Aos Amigos que fiz no mestrado Ozana, Joaquim, Juliana, Eduardo e Stela pela convivência e amizade que tornou a distância de casa menor e me fez sentir saudades de Curitiba.

À minha família por compreender os momentos de ausência e apoiar minhas escolhas.

E a pessoa que indiscutivelmente viveu cada momento deste trabalho comigo, esteve presente nas ocasiões de alegrias, angustias e ansiedade. Foi companheiro dando apoio e alento em todos os momentos, apoio sem o qual não acredito ter sido capaz de percorrer esta jornada. Will, muito obrigada!

A todos que direta e indiretamente colaboraram para o desenvolvimento deste trabalho... **OBRIGADA!!!!!!!!!!**

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 IMPORTÂNCIA DO GÊNERO	1
1.2 POSIÇÃO TAXONÔMICA	2
1.3 SAÚVAS E BIODIVERSIDADE	5
1.4 DNA MITOCONDRIAL	8
2 OBJETIVOS	11
3 MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1 OBTENÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS ESPÉCIMES	12
3.2 ESTUDOS MOLECULARES	13
3.2.1 Extração de DNA	13
3.2.2 Reação de PCR	14
3.3 MORFOLOGIA	14
3.3.1 Escolha dos Espécimes, Confeção das Pranchas e Microscopia	14
3.4 ANÁLISE DOS DADOS	15
4 RESULTADOS	16
4.1 ESTUDOS MOLECULARES	16
4.2 MORFOLOGIA	21
5 DISCUSSÕES	28
6 CONCLUSÕES	32
REFERÊNCIAS	33

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – ESPÉCIES UTILIZADAS, LOCAL DE COLETA DOS ESPÉCIMES, NÚMERO DE POPULAÇÕES E COLABORADORES	12
TABELA 2 – POSIÇÕES VARIÁVEIS (ARRANJADAS VERTICALMENTE) DE SEQÜÊNCIAS DE COI DE <i>Atta cephalotes</i> , ORIUNDAS DOS ESTADOS DA BAHIA, DE ALAGOAS , DO AMAZONAS; DA NICARÁGUA, DA COLÔMBIA E DA VENEZUELA	18
TABELA 3 – DISTÂNCIA DE NUCLEOTÍDEOS (%) ESTIMADA EM 500 PARES DE BASES (pb) PARA SEQÜÊNCIAS DE COI DE INDIVÍDUOS DE <i>Atta</i> <i>cephalotes</i> E <i>Atta sexdens sexdens</i> (outgroup). DISTÂNCIA CALCULADA DENTRO E ENTRE OS GRUPOS POR 2P	21

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 – GENOMA MITOCONDRIAL COM APROXIMADAMENTE 17 Kb. SETA INDICA POSIÇÃO DE GENE MITOCONDRIAL CITOCROMO OXIDASE I (COI). (Barcodes of life <<http://www.barcodinglife.org>>)9
- FIGURA 2 – LOCAL DE COLETA DE *Atta cephalotes* e *Atta sexdens sexdens*13
- FIGURA 3 – RELAÇÕES FILOGENÉTICAS INFERIDAS POR “NEIGHBOR-JOINING” UTILIZANDO 500 PARES DE BASE (pb). VALORES DE “BOOTSTRAP”, BASEADO EM 1000 REPLICAÇÕES, MAIORES QUE 50%, SÃO APRESENTADOS NOS RAMOS DAS ÁRVORES; NÚMEROS ENTRE PARÊNTESES REPRESENTAM SEQUÊNCIAS DE *Atta cephalotes* e *Atta sexdens sexdens*20
- FIGURA 4 – VISTA LATERAL DE *Atta cephalotes* (exemplar de Manaus-AM). PILOSIDADE DE MESOSOMA E GÁSTER FOI OMITIDA. **cab** = CABEÇA; **ant** = ESCAPO DA ANTENA; **c1**, **c2** e **c3** = Coxa 1, 2 E 3; **emt** = ESPINHO METAPLEURAL; **eocp** = ESPINHO OCCIPITAL; **et** = ESTERNO; **ems** = ESPINHO MESOSOMAL; **f** = FRONTE; **mes** = MESOSOMA; **o** = OLHO; **ocp** = OCCIPÍCIO; **p** = PECÍOLO; **tr** = TERGO; **ga** = GÁSTER; **epr** = ESPINHO PRONOTAL; **v** = VÉRTICE. TODAS AS BARRAS, DOS DESENHOS, CORRESPONDEM A 2MM24
- FIGURA 5 – VISTA SUPERIOR DA CABEÇA DE OPERÁRIA MÁXIMA DE *Atta cephalotes*. **A**, CLADO 1; **B**, CLADO 2. **ocp** = OCCIPÍCIO; **v** = VÉRTICE. BARRA = 0,025 MM25
- FIGURA 6 – VISTA LATERAL DA CABEÇA DE OPERÁRIA MÁXIMA DE *Atta cephalotes*. **A** e **B**, CLADO 1; **C** e **D**, CLADO 2. **cf** = CARENA FRONTAL; **eocp** = ESPINHO OCCIPITAL; **f** = FRONTE; **mocp** = MARGEM OCCIPITAL; **sop** = SULCO OCCIPITAL; **v** = VÉRTICE26
- FIGURA 7 – VISTA FRONTAL, POR MICROSCOPIA, DA CABEÇA DE OPERÁRIA MÁXIMA DE *Atta cephalotes*. **A**, CLADO 1; **B**, CLADO 2. **cf** = CARENA FRONTAL; **f** = FRONTE; **mocp** = MARGEM OCCIPITAL; **socp** = SULCO OCCIPITAL; **v** = VÉRTICE27
- FIGURA 8 – VISTA LATERAL DE MESOSOMA DE OPERÁRIA MÁXIMA DE *Atta cephalotes*. **A** e **B**, CLADO 1; **C** e **D**, CLADO 2. **ems** = ESPINHO MESONOTAL; **emt** = ESPINHO METAPLEURAL; **epr** = ESPINHO

PRNOTAL28

RESUMO

ESTUDOS MORFOLÓGICOS E ANÁLISES DE SEQUÊNCIAS DO GENE MITOCONDRIAL CITOCROMO OXIDASE I (COI) EM POPULAÇÕES DE *Atta cephalotes* (L., 1758)

Atta cephalotes é uma espécie de formiga cortadeira considerada florestal, sendo a mais exigente quanto à umidade de solo entre as *Atta*. Nas América Central e do Sul, é responsável por danos agrícolas devido ao hábito de cortar, principalmente, dicotiledôneas. Com a fragmentação da Mata Atlântica e a degradação da área de ocorrência, vem sofrendo redução em suas populações, sobretudo no nordeste brasileiro. Neste trabalho, foram examinadas sequências de DNA do gene mitocondrial citocromo oxidase I (COI) de diversas populações de *A. cephalotes* com o objetivo de examinar as relações filogenéticas entre populações coletadas em duas áreas de distribuição desta espécie. Também foram investigadas variações morfológicas em operárias maiores (soldados). A análise de um segmento de 500 pb do gene COI sugere a existência de subestruturação genética entre as populações da espécie nominal, dividindo o grupo em dois clados. Estes clados são totalmente isolados geograficamente, sendo o primeiro ocorrendo na América Central e do Sul e o outro no nordeste do Brasil. Além disso, as diferenças morfológicas encontradas sustentam a formação dos clados e sugerem a necessidade de revisão taxonômica desta espécie.

Palavras-chave: formiga cortadeira, COI, DNAm, morfologia, taxonomia

ABSTRACT

MORPHOLOGICAL STUDIES AND ANALYSIS OF THE MITOCHONDRIAL GENE CYTOCHROME OXIDASE I (COI) IN POPULATIONS OF *Atta cephalotes* (L., 1758)

Atta cephalotes is a forestry leaf-cutting ant and is the most demanding in relation to soil moisture among *Atta* species. In Central and South America, it is considered an agricultural pest due to cutting damage in dicotyledonous crops. With the fragmentation of the Brazilian Atlantic forest and the degradation of its habitat, this species is suffering a population decline, mainly in the Brazilian northeast. In this work, DNA sequences of the mtDNA cytochrome oxidase I (COI) were examined of several populations of *A. cephalotes* with the objective of examining the phylogenetic relationship among populations collected in two distribution areas of this species. Morphological variations were also investigated in larger workers (soldiers). The analysis of a 500 pb segment of the gene COI suggests the existence of a genetic substructure of the nominal species, dividing the populations in two clades. These clades are totally geographically isolated, the first occurring in Central and South America and the other in northeastern Brazil. Also, morphological differences found in the studied specimens support the formation of the two clades and indicate the need for taxonomical revision in this species.

Key words: leaf-cutting ant, COI, mtDNA, morphology, taxonomy.

INTRODUÇÃO

1.1 Importância do Gênero

As formigas (Hymenoptera, Formicidae) mantêm seu sucesso ecológico há mais de 50 milhões de anos segundo Hölldobler e Wilson (1990). Esse sucesso parece decorrer especialmente do fato de terem sido o primeiro grupo predador social explorando o solo e a vegetação.

O comportamento eussocial das formigas, aliado ao pequeno tamanho de suas forrageiras, lhes permite penetrar em locais de difícil acesso a outros insetos sociais, tais como vespas e abelhas, e obter alimentos. Extremamente importante ao sucesso das formigas é o refinamento de suas especializações, de tal forma que grupos de indivíduos executam todos a mesma tarefa. Por exemplo, um primeiro grupo busca alimento, enquanto um segundo recebe este alimento e transfere para as larvas.

As formigas cortadeiras (Tribo Attini) fornecem vantagens singulares para investigar algumas questões biológicas, populacionais e evolutivas. A colônia pode ser considerada como um superorganismo, onde os indivíduos ocupam os lugares de células. Assim, pode-se estudar, através da divisão de tarefas e da existência de castas morfológicas, comportamentais e fisiológicas, quais os processos envolvidos nessa diferenciação, e de que modo, a combinação da divisão de trabalho e das castas favorece um maior sucesso (Sudd e Franks, 1987; Hölldobler e Wilson, 1990).

As formigas cultivadoras de fungos (Formicidae, Myrmicinae, Attini) ocorrem exclusivamente no Novo Mundo, indicando que sua origem, e subsequente radiação por toda a região neotropical, ocorreu depois da separação da América do Sul da África (Weber, 1972). As espécies estão distribuídas desde os Estados Unidos da América (latitude 40° N) até a Argentina (latitude 44° S) (Weber, 1970; Farji-Brener e Ruggiero, 1994). Na América do Sul não estão presentes nas regiões transandinas (Weber, 1972; Farji-Brener e Ruggiero, 1994), e na América Central não ocorrem em algumas ilhas das Antilhas (Mariconi, 1970; Weber, 1972; Della Lucia, 1993).

A tribo Attini atualmente é composta por 13 gêneros e 216 espécies nominais descritas (Brown, 2000; Brandão e Mayhé-Nunes, 2001). Schultz e Méier (1995) salientam que alguns gêneros necessitam de revisão taxonômica devido à existência de muitas espécies. No Brasil, são encontradas 10 espécies e três subespécies do gênero *Atta* (Mariconi, 1970; Della Lucia, 1993), com distribuição geográfica registrada para todo o território nacional.

O gênero *Atta* Fabricius, 1804 (Hymenoptera: Formicidae; Myrmicinae; Attini) compreende as formigas cultivadoras de fungos conhecidas popularmente como saúvas. São consideradas pragas da agricultura brasileira e de outros países da América do Sul e Central por possuírem o hábito de cortar e transportar fragmentos de diversos vegetais causando danos em plantas cultivadas, gramíneas forrageiras e essências florestais (Abreu, 1986; Anjos et al., 1993). No entanto, desempenham um importante papel ecológico; devido à biomassa das colônias e à quantidade de terra removida, as saúvas são, geralmente, os organismos dominantes na maioria dos ecossistemas neotropicais sendo responsáveis pela maior parte do fluxo de energia e nutrientes nestes ecossistemas, somente tornando-se pragas com a introdução da agricultura. As saúvas também são muito importantes na incorporação de matéria orgânica no solo, sendo consideradas importante agente deste fenômeno (Fowler, 1991).

1.2 Posição Taxonômica

O Brasil possui o maior número de espécies do gênero *Atta* e a Amazônia é considerada o centro de dispersão destas espécies (Borgmeier, 1950). Apesar disso, há no país uma escassez de especialistas e de trabalhos taxonômicos (Carvalho, 2000) com este gênero. O número de trabalhos sobre ecologia, biologia, comportamento e controle é muito maior em relação ao número de trabalhos na área taxonômica. Isso se dá devido às dificuldades na identificação dos espécimes, pois isto se baseia em alguns caracteres diagnósticos de operárias - fêmeas degeneradas - que são polimórficas e de tamanho muito variável (Borgmeier, 1959).

Apesar das grandes revisões do gênero terem sido feitas com base em características de genitálias de machos, indivíduos sexuais não costumam ser

empregados em trabalhos de taxonomia devido à dificuldade de obtê-los e relacioná-los aos seus operários, além de não haver muito destes indivíduos conservados em museus (Gonçalves, 1942).

Levando em consideração a gravidade dos problemas causados pelas saúvas, torna-se muito importante uma correta identificação. Além das dificuldades já citadas para taxonomia do gênero, durante um longo período, para sua classificação foi utilizado um sistema pentanominal onde eram determinados o gênero, subgênero, espécie, subespécie e variedade/ forma. Isso colaborou para que diversas espécies sofressem várias alterações em sua classificação, o que, conseqüentemente, gerou constantes alterações nas coleções de referência e confusões no reconhecimento das espécies.

Dentre as espécies de saúva, *Atta cephalotes* (L. 1758), que inicialmente foi descrita como *Formica cephalotes* L., 1758 e, posteriormente, transferida para o gênero *Atta* Fabricius, em 1804, foi uma das espécies que mais sofreu alterações em sua classificação. Esta espécie é considerada florestal e, entre as cortadeiras, a mais exigente quanto à umidade de solo (Weber, 1937). Esta espécie se caracteriza por possuir tufo de pêlos frontais, na cabeça da operária máxima, abundantemente pilosos; espinhos occipitais geralmente bem definidos, tuberculiformes ou pontiagudos; espinhos mesonotais anteriores tuberculiformes ou cônicos e alongados; parte superior da cabeça muito brilhante, com pontuação microscópica pouco visível ou esparsa; espinhos epinotais cônicos, aguçados, pouco mais longos que os mesonotais anteriores, pouco divergentes e voltados para trás quase na mesma direção do plano superior do epinoto; cor parda clara ou escura, a cabeça geralmente pouco mais escura que o resto do corpo (Gonçalves, 1942).

Na primeira grande revisão do gênero Borgmeier (1939) listou 26 espécies, subespécies e variedades. Entre, as espécies, em *A. cephalotes*, foram reconhecidas três subespécies: *A. cephalotes integrior* Forel, 1904, *A. cephalotes opaca* Forel, 1904 e *A. cephalotes erecta* Santschi, 1929. Gonçalves (1942) através da observação de genitálias masculinas dividiu *Atta* em três subgêneros: *Archeata*, *Neoatta* e *Atta*, e em sua listagem dos taxons reconheceu seis subespécies: *A. cephalotes integrior*, *A. cephalotes opaca*, *A. cephalotes polita* Emery, 1905, *A. cephalotes erecta*, *A. cephalotes isthmicola* Weber, 1941 e *A. cephalotes oaxaquensis* Gonçalves, 1942.

Após minuciosa comparação da genitália das espécies e subespécies, Borgmeier (1950) descreveu mais dois subgêneros, *Paleatta* e *Neoatta*, dividindo o gênero em cinco subgêneros. Nessa classificação foram nomeadas cinco subespécies: *A. cephalotes integrrior*, *A. cephalotes opaca*, *A. cephalotes erecta*, *A. cephalotes isthmicola* e *A. cephalotes oaxaquensis*.

Em uma nova revisão, Borgmeier (1959) manteve apenas quatro subgêneros e apresentou *A. cephalotes integrrior*, *A. cephalotes opaca*, *A. cephalotes polita*, *A. cephalotes erecta*, *A. cephalotes isthmicola* e *A. cephalotes oaxaquensis*. Após todas as classificações propostas, *A. cephalotes* passou a ser considerada espécie sem denominação subespecífica (Mariconi, 1970; Della Lucia, 1993).

Pela revisão da literatura taxonômica de *Atta* observa-se que a espécie sofreu alterações ao nível de subespécie devido às variações morfológicas reconhecidas pelos taxonomistas, o que demonstra uma enorme falta de consenso.

A espécie *A. cephalotes* está presente no México, América Central e América do Sul ocorrendo nas Guianas, Suriname, Venezuela, Colômbia, Equador, Peru, Bolívia e Brasil. No Brasil, nos estados do Amazonas, de Roraima, de Rondônia, do Pará, do Amapá, do Maranhão, de Pernambuco, da Bahia, do Acre, do Mato Grosso (Della Lucia, 1993), de Sergipe (Delabie, 1997) e de Alagoas (Corrêa et al., 2005).

Gonçalves (1951, 1960 e 1967) afirma que a ocorrência da espécie no sul do estado da Bahia constitui um interessante problema zoogeográfico, por ser a saúva mais exigente de umidade no solo, não podendo viver nos cerrados do centro do Brasil e nem nas caatingas do nordeste. Carvalho (2000) através da utilização da técnica de RAPD – PCR conseguiu determinar marcadores moleculares que podem colaborar para uma correta identificação das diferentes espécies do gênero *Atta*. Ao comparar populações de *A. cephalotes* oriundas de Caracas-Venezuela e Ilhéus - Bahia o autor encontrou diferenças no padrão de bandas na digestão da região ITS entre os espécimes estudados. Estas observações, associadas às afirmações de Gonçalves (1967), sugerem um possível isolamento geográfico das populações de *A. cephalotes* da Bahia.

1.3. Saúvas e Biodiversidade

A Mata Atlântica é uma das florestas tropicais mais ameaçadas do mundo, sendo o ecossistema brasileiro que mais sofreu com os impactos ambientais dos ciclos econômicos da história do país. Um dos motivos para preservar o que restou dessa floresta é a rica biodiversidade, incluindo espécies vegetais e animais, para sua conservação e manejo (World Wildlife Fund – WWF, 2001). Para se ter uma idéia da situação de risco em que a Mata Atlântica se encontra, basta saber que há época do descobrimento do Brasil ela possuía área equivalente a um terço da Amazônia, ocupando uma área de 1.300.000 Km², estendendo-se do Rio Grande do Norte ao Rio Grande do Sul. Atualmente, está reduzida a apenas 5% de sua área original, ou seja, 65.000 Km² (Ramos, 2001; Silva, 2001; World Wildlife Fund - WWF, 2001).

A expansão do uso da terra, que acompanha o crescimento da população humana, resulta na fragmentação dos habitats naturais com a formação de fragmentos florestais de diferentes tamanhos e formas. Essas alterações podem segundo Bierrgaard et al., (1992), resultar no isolamento de populações e até extinção de espécies, reduzindo a biodiversidade local em função, principalmente, da perda de habitats e de maior incidência de raios solares entre os fragmentos (Wilcox e Murphy, 1985).

Nas florestas tropicais, a maioria das espécies é muito suscetível a processos de extinção, uma vez que essas espécies ocorrem em densidades populacionais muito baixas e participam de interações ecológicas às vezes muito estreitas e complexas com outras espécies, com as plantas floríferas e seus polinizadores, os predadores e suas presas. Assim, a extinção de uma espécie, que mantém relações de dependência com outras, pode promover o desaparecimento de várias outras com as quais ela interage (Myers, 1987).

Na maioria dos casos relatados de fragmentação de florestas tropicais, houve perda de espécies por meio da destruição do habitat natural, redução do tamanho da população, inibição ou redução da migração, efeito de borda alterando o microclima, eliminação de espécies dependentes de outras já extintas e imigração de espécies exóticas para as áreas desmatadas circundantes e, posteriormente, para o fragmento. Espécies raras e com pequena área de distribuição, assim como

aqueles que necessitam de habitats muito amplos ou especializados, parecem mais suscetíveis aos efeitos da fragmentação (Turner, 1996).

Os insetos são adequados para uso em estudos de avaliação de impacto ambiental de efeitos de fragmentação florestal, pois, além de ser o grupo de animais mais numeroso do globo terrestre, com elevadas densidades populacionais, apresentam grande diversidade, em termos de espécies e de habitats, grande variedade de habilidades para dispersão, seleção de hospedeiros e de respostas à qualidade e quantidade de recursos disponíveis, além de sua dinâmica populacional ser altamente influenciada pela heterogeneidade dentro de um mesmo habitat. Também são importantes pelo seu papel no funcionamento dos ecossistemas naturais, atuando como predadores, parasitóides, fitófagos, saprófagos, polinizadores entre outros (Ehrlich et al., 1980; Boer, 1981; Rosenberg et al., 1986; Souza e Brown, 1994; Schoereder, 1997).

De acordo com Brandão (1999), as formigas estão entre os organismos mais conspicuos dos ecossistemas brasileiros. Além de sua abundância local relativamente alta, são especialmente ricas em espécies e diversificadas quanto aos hábitos de forrageamento, nidificação etc. As formigas são insetos utilizados como bioindicadores ecológicos por diversos atributos: dominância no ecossistema, ampla distribuição geográfica, abundância local elevada, riqueza de espécies local e global altas, muitos táxons especializados, facilmente amostradas e separadas em morfoespécies e sensíveis às mudanças ambientais (Majer, 1983).

Corrêa et al. (2005) ao relatarem a ocorrência de *A. cephalotes* no estado de Alagoas verificaram, mais uma vez, o quanto esta espécie é sensível à ação antrópica e, que ainda existe um leque de informações básicas a serem conhecidas a respeito de *Atta*. Concordando com Mariconi (1970) e Kempf (1972), Corrêa et al. (2005) relata a distribuição disjunta desta espécie na região amazônica e nordeste do Brasil. Ao avaliarem 42 remanescentes de floresta Atlântica verificaram a presença de *A. cephalotes* em apenas sete, estes considerados áreas prioritárias para conservação da Mata Atlântica (Ministério do Meio Ambiente - MMA, 2002), mostrou claramente uma forte relação da espécie com áreas florestais bem conservadas.

O fato de o nordeste do país ser caracterizado por altos níveis de fragmentação de florestas (Ranta et al., 1998) leva a acreditar que esta espécie está sujeita a um drástico declínio populacional nas florestas úmidas da região. Além

disso, outra espécie *A.sexdens*, de conduta de forrageamento mais generalista, vem repetidamente substituindo *A. cephalotes* em fragmentos secundários da Floresta Atlântica no nordeste. Uma tendência semelhante a essa pode ser observada na restinga onde *Atta robusta* Borgmeier, 1939 está sendo substituída por *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (Fowler, 1995; Fowler et al., 1996). Isso demonstra que *A. cephalotes* é uma espécie de formiga cortadeira sensível à fragmentação (Corrêa et al, 2005).

1.4 DNA mitocondrial

Informações moleculares são fontes de caracteres e muitas vezes permitem a resolução de relações filogenéticas em situações em que a morfologia não pode resolver. De acordo com Avise (1997) é comum estudos de DNA mitocondrial (DNAMt) revelarem variações entre populações de diferentes áreas geográficas.

Desde a década de 1970 a análise do DNAMt tem se estabelecido como uma poderosa ferramenta para estudos evolutivos em animais (Moritz et al., 1987). O genoma mitocondrial dos animais é, na grande maioria dos casos, constituído por uma molécula de DNA circular pequena, com conteúdo gênico conservado (apenas 37 genes) e estrutura gênica simples (não possui DNA repetitivo, transposons, intros ou pseudogenes) (Moritz et al., 1987). Essa extrema economia de conteúdo da maioria dos genomas mitocondriais animais é atribuída a uma intensa seleção a favor de um genoma pequeno (Moritz et al., 1987).

Por outro lado, essa molécula apresenta uma alta taxa de evolução por mutação (Brown, 1985), cerca de cinco a 10 vezes mais rápida do que a taxa de mutação de um gene nuclear de cópia única (Moritz et al., 1987; Harrison, 1989). Estima-se que em primatas, a evolução do DNAMt seja até dez vezes maior do que a evolução de um gene nuclear de cópia única (Brown et al., 1979; Moritz et al., 1987). No entanto, genes nucleares, envolvidos na biogênese mitocondrial, evoluem mais rapidamente que os demais, possuindo a mesma taxa de evolução do DNAMt (Pietromnaco et al., 1986; Moritz et al., 1987). Ainda, alguns organismos possuem a taxa de evolução do genoma mitocondrial igual a de um gene nuclear de cópia única, como por exemplo, em *Drosophila* (Powell et al., 1986).

O DNAMt (Figura 1) possui genes codificadores para duas subunidades ribossômicas (12S e 16S), 22 RNAt, três subunidades da enzima citocromo c oxidase (COI, COII e COIII), citocromo B (cytB), subunidades 6 e 8 de ATP F0 sintase (ATP6 e ATP8) e sete subunidades da NADH desidrogenase (ND1-ND6 e ND4L). Além de todos esses genes, há uma região rica em A+T (em vertebrados, é chamada D-loop), não-codificadora e que parece conter o controle da replicação e transcrição de DNAMt (Wolstenholme, 1992). O tamanho dessa região exhibe grande variação entre os organismos, ao contrário dos genes, que se apresentam similares

em tamanho em uma ampla gama de espécies, entre invertebrados e vertebrados sendo detectado por vezes polimorfismo de tamanho a nível interespecífico (Brown, 1983; Moritz et al., 1987).

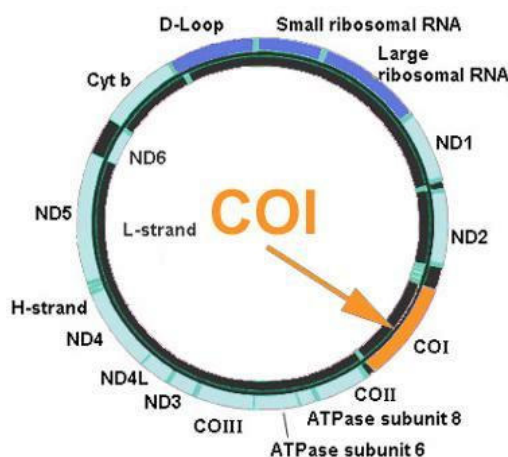


Figura 1 - Genoma mitocondrial com aproximadamente 17 Kb. Seta indica posição do gene da citocromo oxidase subunidade I (COI). (Barcodes of Life <<http://www.barcodinglife.org/>>).

Devido ao fato do DNAm ser de herança materna, estudar a diferenciação dessa molécula equivale a estudar a população de fêmeas. Isso, combinado com o fato do DNAm ser haplóide, faz com que o tamanho efetivo da população estudada seja quatro vezes menor do que quando se utiliza um marcador molecular diplóide (Haavie et al., 2000).

A combinação dessas características faz com que o DNAm seja amplamente utilizado em estudos de caracterização de populações, subespécies e espécies, além de estudos de caráter evolutivo e filogenético (Harrison, 1989).

O gene mitocondrial da enzima citocromo oxidase subunidade I (COI) (Figura 1) vem sendo usado com bastante frequência em estudos das relações filogenéticas por apresentar regiões variáveis suficientes para análises de grupos taxonomicamente relacionados (Sahls e Nyblom, 2000) e devido à disponibilidade de “primer”s para amplificar genes inteiros para diferentes grupos de insetos (Simon, et al., 1994). Desta forma, seqüências de COI têm sido empregadas em muitos

trabalhos de relações filogenéticas em insetos (Dobler e Muller, 2000; Sahls e Nyblom, 2000, Scarpassa et al., 2000).

Caterino et al., (2000) em sua revisão sobre a sistemática molecular de insetos relatou vários trabalhos relacionados ao uso dos genes COI e COII e em relação à sistemática molecular de formigas (Ayala et al., 1996; Wetterer et al., 1998; Chiotis et al., 2000). Entretanto, esta técnica tem sido pouco aplicada para elucidar problemas taxonômicos para os gêneros *Atta* e *Acromyrmex*.

2 OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram: 1. elucidar a possibilidade da existência de espécies diferentes entre as populações de *A. cephalotes* oriundas da região amazônica, América Central e nordeste do país através de estudos morfológicos e moleculares; 2. caracterizar as populações de *A. cephalotes* utilizando características morfológicas e moleculares; 3. observar o compartilhamento de caracteres morfológicos e moleculares entre e dentro das populações.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção e Identificação dos Espécimes

As amostras de *Atta cephalotes* e *Atta sexdens sexdens* foram obtidas com o auxílio de colaboradores nos locais de ocorrência da espécie (Tabela 1 e Figura 2).

Os espécimes coletados foram armazenados em álcool 70% em temperatura ambiente até o recebimento no laboratório, onde foram armazenados em freezer a -20° C para melhor conservação.

A identificação dos espécimes, utilizados operárias maiores (soldados), neste estudo, foi realizada através de chaves dicotômicas e o auxílio de pesquisadores que trabalham com Formicidae. Populações de *Atta sexdens sexdens* foram incluídas nas análises como “outgroups” para verificar a relação interespecífica dentro de *A. cephalotes* e comparar os níveis de divergência genética.

Tabela 1 – Espécies de *Atta* utilizadas, local de coleta dos espécimes, número de populações e colaboradores.

Espécie	Localidade	UF	País	Nº. de pop.	Colaboradores
<i>A. cephalotes</i>	Barra do Rocha	BA	Brasil	5	J. Delabie
	Ilhéus	BA	Brasil	4	J. Delabie
	Águas de Olivença	BA	Brasil	1	J. Delabie
	Maceió	AL	Brasil	1	A. Mendonça
	Manaus	AM	Brasil	2	J.D. Ribeiro
	Caracas	-	Venezuela	1	?
	Aragua	-	Nicarágua	1	?
	Restrepo	-	Colômbia	1	?
<i>A. s. sexdens</i>	Barra do Rocha	BA	Brasil	1	J. Delabie
	Campinhos	BA	Brasil	1	J. Delabie
	Manaus	AM	Brasil	1	R. Ale-Rocha
	Bananeiras	PB	Brasil	1	J. Delabie



Figura 2 - Locais de coleta dos espécimes de *A. cephalotes* e *A. s. sexdens*.

3.2 Estudos Moleculares

3.2.1 Extração de DNA

A extração de DNA total foi realizada individualmente a partir da cabeça e pernas dos espécimes conservados em álcool 70% e freezer -20° C, de acordo com a disponibilidade de material, através do protocolo de Carvalho e Vieira (2001).

3.2.2 Reação de PCR (Reação de Polimerase em Cadeia)

As reações de PCR foram conduzidas em tubos de microcentrífuga de 0,6 ml em um volume total de 20 µL, contendo em cada, tampão 10x, MgCl₂ (13,3 mM), dNTPs (0,13 mM), 0,5 µM de cada “primer”, 50ng de DNA total, 5 U de *Taq* polimerase e água. As amplificações foram realizadas em termociclador PTC-100TM (MJ Research, Inc.) de acordo com Hebert et al., (2003). Foram utilizados os “primers” 1 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') e 2 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3') conforme sugerido por Folmer et al. (1994). Os produtos das reações foram visualizados em gel de agarose 1%, corados em brometo de etídio (0,05%). Amplificações controle (componentes da reação excluindo DNA) foram montadas para cada grupo de extração, para verificar possíveis contaminações de DNA. O produto de PCR foi purificado com o Dispositivo de Ultrafiltração Microcon-P (Millipore) de acordo com instruções do fabricante e utilizado nas reações de seqüenciamento, utilizando os mesmos “primers”.

Para as reações de seqüenciamento foi utilizado o kit DYEnamic ET Dye Terminator (Amersham Biosciences). As amostras foram preparadas num volume total de 10µL, contendo: 100 ng de DNA molde e 6 pmols dos “primers” 1 e 2' e 4µL do fluróforo. O programa utilizado para amplificação foi: 95°C por 20s, 35 ciclos de: 55°C - 15 s, 60°C - 1 min e mantido a 4°C após a reação. Os produtos das reações de seqüenciamento foram concentrados e purificados usando a precipitação por etanol. Após amplificação com os “primers” o gene COI foi seqüenciado em equipamento MegaBace 1000 (Amersham Biosciences).

3.3 Morfologia

3.3.1 Escolha dos Espécimes, Confeção das Pranchas e Microscopia

Após o recebimento das amostras para a caracterização morfológica, dez exemplares de cada uma das populações foram observados. Os indivíduos foram

montados em alfinetes entomológicos para a identificação e localização dos caracteres que distinguíssem corretamente as espécies e caracterizassem as diferentes populações.

Após minuciosa observação dos espécimes, estes foram desenhados e fotografados sob microscópio estereoscópico acoplado à câmara clara, da marca Leica modelo MZ6

Posteriormente, para uma melhor visualização dos caracteres, observados nos espécimes, foram feitas fotos em Microscopia de Baixo Vácuo no Centro de Microscopia da Universidade Federal do Paraná - UFPR.

Os desenhos foram corrigidos e comparados uns com os outros, com a microscopia e com os espécimes escolhidos, de cada população estudada. A nomenclatura para descrição das estruturas foi baseada em Bolton (1994), Shattuck (1999) e Borgmeier (1950).

Foram consultadas as coleções do Museu de Zoologia – USP, onde está depositada a coleção do frei Kempf, que inclui a do frei Thomas Borgmeier. As amostras também foram comparadas com a Coleção Costa Lima do Museu da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro –UFRRJ, onde está depositado o material de Gonçalves (1942).

3.4 Análise de Dados

As seqüências obtidas foram alinhadas com o auxílio dos programas BioEdit v. 7.0 (Hall, 1999) e Sequencher v. 4.5 (Genecodes, Inc, Ann Arbor, Michigan USA) e ajustadas manualmente. A divergência das seqüências de nucleotídeos foi calculada usando o modelo de Kimura-2-parâmetros (K2P) e a relação filogenética entre os grupos analisada por “Neighbor-joining” (NJ), ambos utilizando o programa Mega v. 3.0 (Molecular Evolutionary Genetic Analysis; Kumar et al, 1993). A árvore filogenética foi construída com o auxílio do programa Mega v. 3. A robustez dos resultados foi estimada por “bootstrap” (BS) com 1000 replicações utilizando suportes maiores que 50% (Hebert et al., 2003).

4 Resultados

4.1 Estudos Moleculares

A extração de DNA, tanto da cabeça quanto das pernas, produziu quantidade suficiente de DNA de boa qualidade para a realização das análises. A utilização de pernas possibilita a extração do material sem que ocorra a perda do exemplar, como já vem sendo utilizado em estudos realizados com material depositado de museu (Hebert et al., 2004; Simmons, 2004). Através da utilização dos “primer” 1 e 2 eram esperadas bandas com 700 pares de base (pb) baseado em sequência de DNAm de drosófila (Simmons, 2004). As amplificações controle, feitas para cada grupo de extração, apresentaram-se negativas após visualizações dos géis.

Foram analisadas 16 seqüências, de 500 pares de base (pb) de *A. cephalotes*: Nicarágua (1), Venezuela (1), Colômbia (1) e Amazônia (2), Bahia (10) e Alagoas (1). As seqüências apresentaram uma composição média de 31,4% de A e T, que é típica de DNA mitocondrial de insetos e do gene COI em particular (Clary e Wolstenholme, 1985). Após a tradução de cada seqüência foi verificada a não existência de “stop codons”.

Foram encontrados nove haplótipos (I-IX) (Tabela 2). Dentre os nove haplótipos observados, não houve haplótipo de ocorrência geral em todas as localidades onde amostras foram coletadas. Quatro haplótipos foram encontrados nas cinco populações obtidas da Nicarágua, Venezuela, Colômbia e Manaus, respectivamente (haplótipos I, II, III, IV) (Tabela 2).

Dentre os indivíduos amostrados na Bahia e em Alagoas, dois haplótipos foram exclusivos, cada um deles encontrado em apenas um espécime de *A. cephalotes*, um do município Barra do Rocha (VIII) e o outro de Ilhéus (IX). Um outro haplótipo foi formado por indivíduos coletados nos municípios de Ilhéus, Águas de Olivença e Barra do Rocha (V). Três populações de *A. cephalotes* oriundas de Ilhéus, Maceió e Barra do Rocha formaram um sexto haplótipo (VI). Indivíduos das populações 9 e 10, ambas do município de Barra do Rocha apresentaram o haplótipo (VII) (Tabela 2).

Tabela 2 - Posições variáveis (arranjadas verticalmente) de seqüências de COI de *Atta cephalotes* oriundas dos estados da Bahia, de Alagoas, do Amazonas e da Nicarágua, da Colômbia e da Venezuela.

Espécies ¹	Posições variáveis ²																										LOCALIDADES/ HAPLÓTIPOS	
	0	0	0	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3	3	3	3	4	4	4	4	4		4
	0	4	6	0	9	1	1	2	3	4	6	6	6	7	8	1	3	4	4	5	8	0	0	1	5	6		8
	4	3	1	0	3	2	7	9	8	1	2	5	8	7	9	9	4	0	9	2	5	3	9	8	7	3	1	
A. cephalotes - BA (1)	C	T	T	C	T	T	G	T	T	G	T	C	T	C	G	C	G	A	G	G	G	T	T	T	T	C	A	Ilhéus/ V
A. cephalotes - BA (2)	A. de Olivença/ V
A. cephalotes - BA (7)	Ilhéus/ V
A. cephalotes - BA (8)	B. do Rocha/ V
A. cephalotes - AL	A	Maceió/ VI
A. cephalotes - BA (4)	A	Ilhéus/ VI
A. cephalotes - BA (6)	A	B. do Rocha/ VI
A. cephalotes - BA (9)	A	B. do Rocha/ VII
A. cephalotes - BA (10)	A	B. do Rocha/ VII
A. cephalotes - BA (3)	A	.	A	B. do Rocha/ VIII
A. cephalotes - BA (5)	.	C	Ilhéus/ IX
A. cephalotes - AM (1)	T	A	C	T	C	C	.	C	C	T	.	.	A	.	A	T	A	.	A	A	A	C	C	.	.	.	T	Manaus/ I
A. cephalotes - AM (2)	T	A	C	T	C	C	.	C	C	T	.	.	A	.	A	T	A	.	A	A	A	C	C	.	.	.	T	Manaus/ I
A. cephalotes - VE	T	A	C	T	C	.	.	C	C	T	.	.	A	.	.	T	A	G	A	.	A	C	C	Caracas/ II
A. cephalotes - NI	T	A	.	T	C	C	A	C	.	C	C	T	A	T	A	T	A	G	A	.	A	C	C	C	C	T	T	Aragua/ III
A. cephalotes - CO	T	A	C	T	C	C	A	C	.	T	.	.	G	.	A	T	A	.	A	A	A	C	C	.	.	.	T	Restrepo/ IV

¹ Números entre parênteses representam seqüências de *A. cephalotes*;

² Pontos representam letras iguais;

³ Algarismos romanos representam haplótipos formados por seqüências de *A. cephalotes*.

- Representa "gaps" verdadeiros, o que diferencia o haplótipos VI do VII.

A análise da árvore filogenética indica que as populações da espécie *A. cephalotes*, como atualmente designadas, formam nitidamente dois grupos geneticamente distintos. Formigas provenientes do nordeste do Brasil (sul da Bahia e Maceió-AL) formam um clado bem estruturado, enquanto que espécimes coletados na Amazônia (AM), Colômbia (CO), Nicarágua (N) e Venezuela (VE) formam outro clado (clados 2 e 1, respectivamente (Figura 2)). Clado 2, que contém os haplótipos encontrados exclusivamente na região nordeste e apresenta forte suporte por bootstrap (99%). Clado 1, que contém somente os haplótipos coletados na região amazônica e na América Central também apresentaram grande suporte pelo bootstrap (86%).

As seqüências depois de alinhadas foram analisadas através do modelo de Kimura-2-Parâmetros (K2P), para que a divergência entre e dentro dos grupos fosse determinada. Quando foram comparadas entre si, todas as populações de *A. cephalotes* apresentaram uma divergência intraespecífica de 3,9% (dados não mostrados), divergência esta considerada alta entre populações de uma mesma espécie (Simmons, 2004).

Os espécimes do clado 1 (populações coletadas na região amazônica e Nicarágua) apresentaram uma divergência interna de 2,8%, valor semelhante ao encontrado para *A. s. sexdens* e quase o dobro da encontrada entre as populações da região nordeste que formam o clado 2 (Tabela 3). Quando as populações do clado 1 e do clado 2 foram comparadas com o “outgroup” (*A. s. sexdens*) verificou-se que a divergência entre elas foi semelhante (Tabela 3). Entre as populações de *A. cephalotes* do clado 1 e do clado 2 foi encontrada uma divergência de 6,5%, a qual é superior a duas vezes a divergência encontrada dentro de cada clado (Tabela 3).

Os valores da divergência entre as populações, que formam o clado 1, ajudam a reforçar a hipótese da existência de espécies crípticas dentro do que atualmente é reconhecido como *A. cephalotes* (Tabela 3).

Tabela 3 - Distância de nucleotídeos (%) e erro padrão (EP) estimada em 500 pares de bases (pb) para seqüências de COI de indivíduos de *A. cephalotes* e *A. s. sexdens* (outgroup). Distância calculada dentro e entre os grupos por K2P.

	Nucleotídeo K2P ± EP (média dentro dos grupos)	Nucleotídeo K2P ± EP (média entre grupos)	
		<i>A. s. sexdens</i>	Clado 2
<i>A. s. sexdens</i> (n=4)	2,6% ± 1,0%	-	-
Clado 2 (n=11)	1,5% ± 0,3%	18,4% ± 0,4%	-
Clado 1 (n=5)	2,8% ± 0,4%	17,2% ± 0,4%	6,5% ± 0,04%

4.2 Morfologia

As observações dos caracteres morfológicos (Figura 4) nos espécimes permitiram verificar que os indivíduos que compõem o clado 1 (populações da Amazônia, Colômbia, Venezuela e Nicarágua) apresentam vértice e occipício opaco recobertos por pontuações microscópicas muito próximas (Figura 5A). Diferentemente, os indivíduos do clado 2 (populações do nordeste brasileiro) apresentam vértice e occipício muito brilhantes com pontuações microscópicas extremamente esparsas (Figura 5B). Os pêlos das populações do clado 1 se dispõem em forma de dois tufo que recobrem a fronte e todo o vértice, deixando à mostra as margens dos lobos cefálicos, e se estendendo à região atrás dos olhos (Figuras 6AB). Neste clado, os pêlos dos indivíduos são longos, lanosos e embaraçados, são voltados para diversas direções sem uniformidade de distribuição (Figura 7A).

As populações do clado 2 também possuem dois tufo de pêlos que não se encontram, recobrem a fronte e metade do vértice, não alcançando a região dos olhos (Figura 6CD). Os pêlos curtos, lanosos e pubescentes estão dispostos em tufo voltados para o cíleo (Figura 7B). Comparativamente, o sulco occipital nos indivíduos do clado 1 é aprofundado entre os lobos cefálicos (Figura 7A) enquanto, o clado 2 apresenta-o pouco profundo (Figura 7B). Ambos os clados apresentam carena frontal com um processo espinhoso, porém no clado 1 o processo possui aproximadamente metade do comprimento horizontal da carena e está voltado para a inserção da antena (Figura 7A). Já no clado 2, este processo é pontiagudo e de tamanho semelhante ao comprimento da carena (Figura 7B). Indivíduos de ambos os clados possuem um par de espinhos occipitais, no clado 1 ele está posicionado acima da linha mediana da cabeça na direção da ponta do espinho pronotal enquanto, que no clado 2 se localiza próximo à inserção da cabeça, com mesosoma, e acompanha o contorno da mesma (Figuras 6BD).

Quando foram feitas as comparações entre os mesosomas de cada um dos clados verificou-se que no clado 1 os espinhos pronotais são longos, pontiagudos e voltados para a cabeça. Os espinhos mesonotais são mais curtos, aproximadamente

um quarto dos pronotais, também pontiagudos, porém voltados para o gáster. Os espinhos metapleurais são longos, três quartos dos pronotais em comprimento, pontiagudos e voltados para cima (Figuras 8AB).

Nos espécimes que compõem o clado 2 os espinhos pronotais são pontiagudos, não alcançando a região média do occipício. Os mesonotais são em forma de montículos voltados para cima, aproximadamente um terço dos pronotais, e os espinho metapleurais são longos, pontiagudos e voltados para o gáster, ultrapassando os pronotais (Figuras 8CD).

O número de dentes, mandibulares, das duas populações é bastante variável assim como a presença e ausência e o número de ocelos, sendo que estes caracteres não são discriminantes para diferenciação entre os espécimes dos clados 1 e 2.

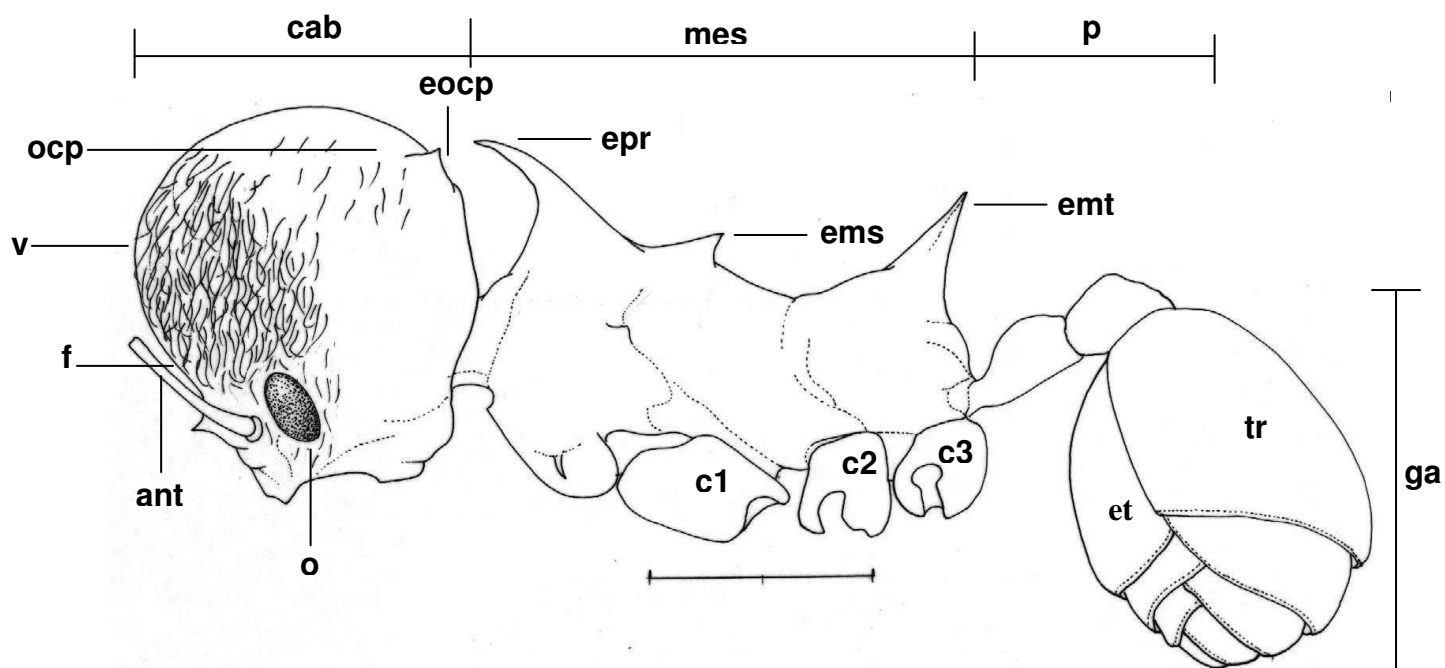


Figura 4 - Vista lateral de *A. cephalotes* (Manaus – AM). Pilosidade do mesosoma e gáster foi omitida. **cab** = cabeça; **ant** = antena; **c1, c2 e c3** = coxa 1, 2 e 3; **emt** = espinho metapleural; **eocp** = espinho occipital; **et** = esterno; **ems** = espinho mesonotal; **f** = frente; **mes** = mesosoma; **o** = olho; **ocp** = occipício; **p** = pecíolo; **tr** = tergo; **ga** = gáster; **epr** = espinho pronotal; **v** = vértice. Todas as barras, dos desenhos, correspondem a 2mm.

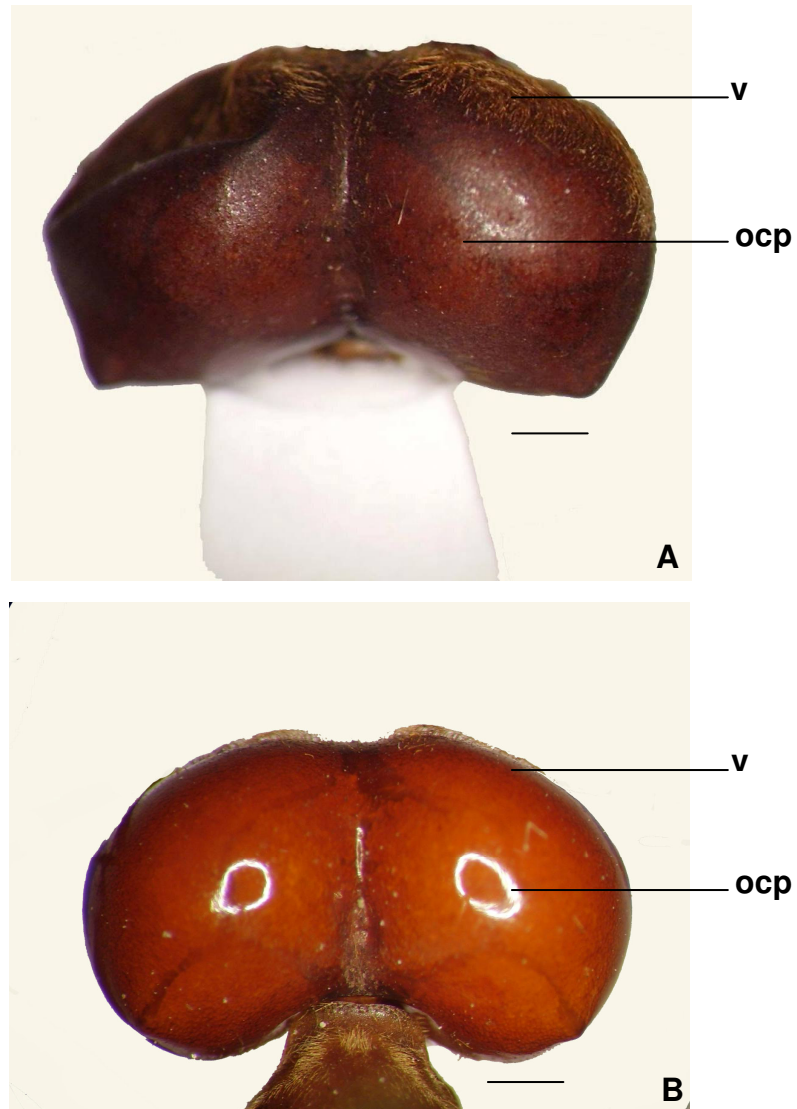


Figura 5 – Vista superior da cabeça de operária máxima de *Atta cephalotes*. **A**, clado 1; **B**, clado 2. **ocp** = occipício; **v** = vértice. Barra = 0,025 mm.

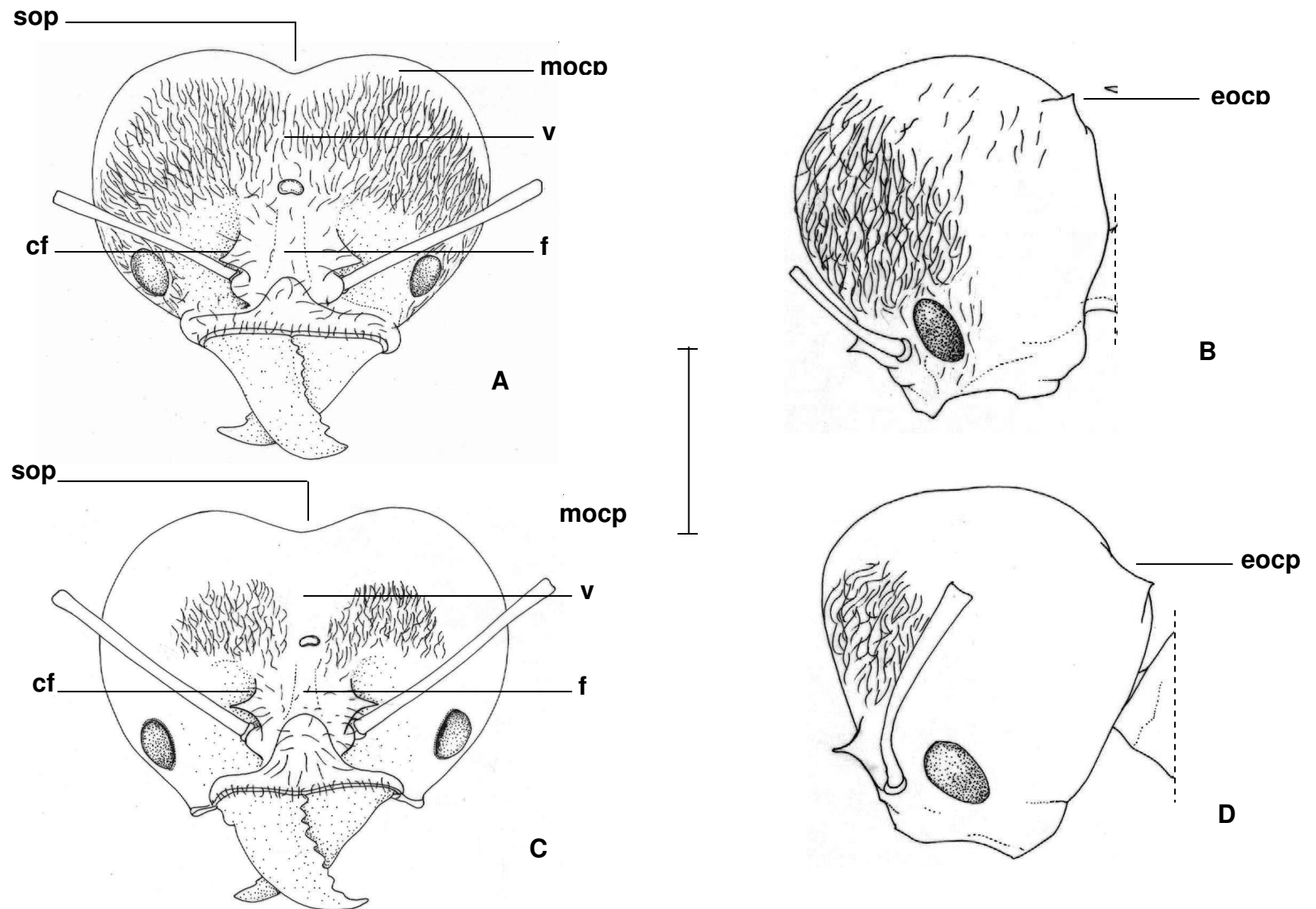


Figura 6 - Vista frontal e lateral da cabeça de operária máxima de *A. cephalotes*. **A** e **B**, clado 1; **C** e **D**, clado 2. **cf**: carena frontal; **eocp** = espinho occipital; **f** = fronte; **mocp**: margem occipital; **sop**: sulco occipita; **v** = vértice.

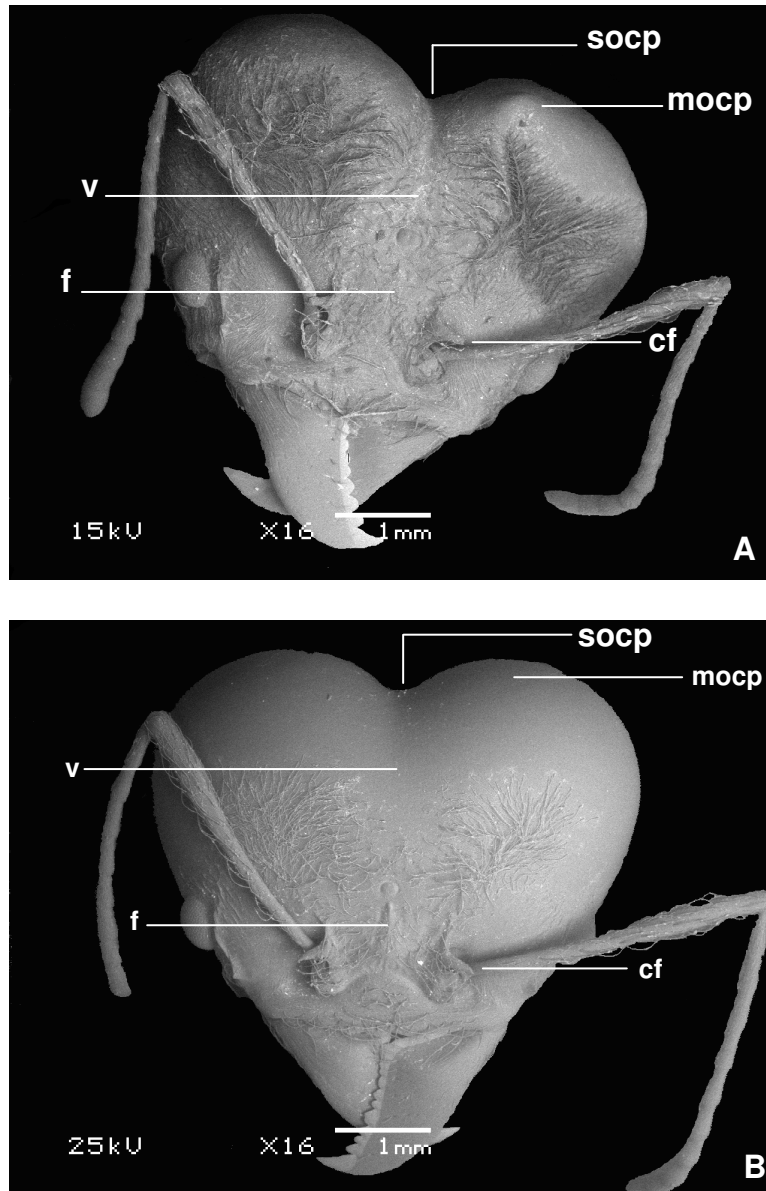


Figura 7 - Vista frontal, por microscopia, da cabeça de operária máxima de *A. cephalotes*. **A**, clado 1; **B**, do clado 2. **cf** = carena frontal; **f** = fronte; **mocp** = margem occipital; **socp** = sulco occipital; **v** = vértice.

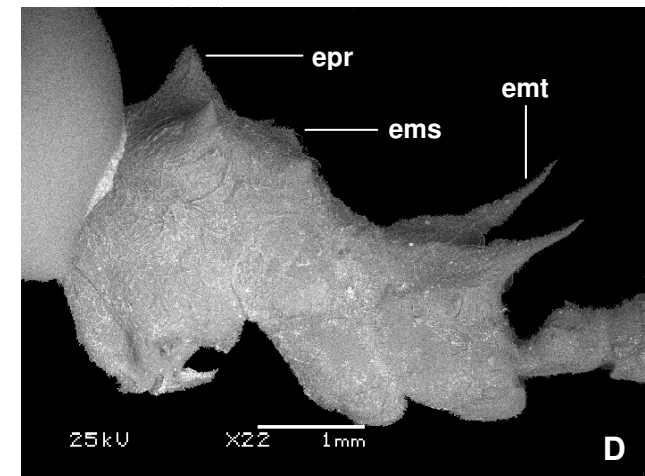
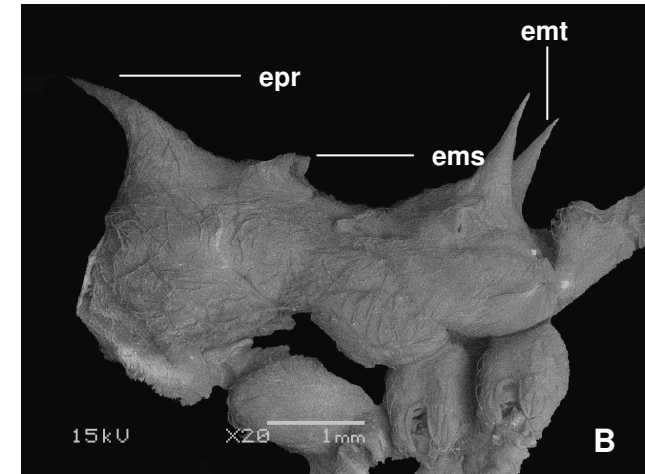
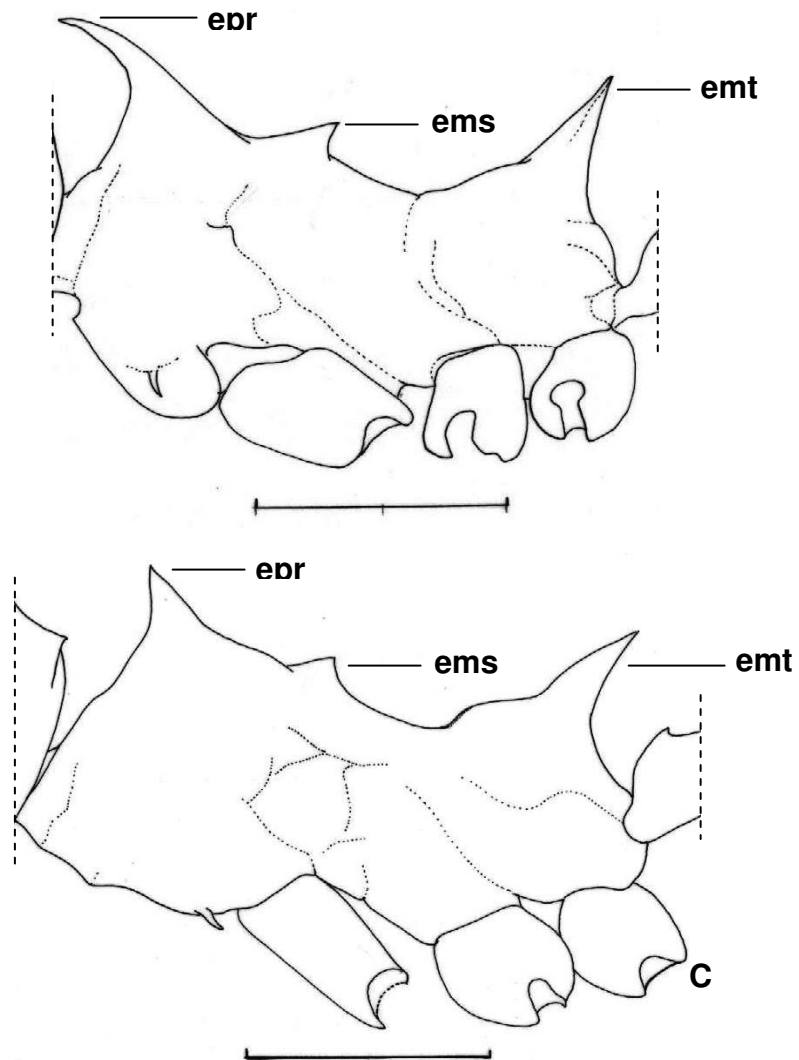


Figura 8 - vista lateral do mesosoma de operaria maxima de *A. cephalotes*. **A** e **B** clado 1; **C** e **D** clado 2. **ems** = espinho mesonotal; **emt** = espinho metapleural; **epr** = espinho pronotal

5 Discussão

DNA mitocondrial tem se mostrado bastante útil para estudar a variação genética e os limites taxonômicos entre espécies e complexos de espécies (Landry et al. 1999; Kruse e Sperling, 2001). Em particular, Hebert et al., (2003) propuseram que um sistema de código de barras do DNA para o reino animal poderia se basear na diversidade de uma parte da seqüência do gene da subunidade I da citocromo oxidase (COI). Esta nova iniciativa é conhecida como “*DNA Barcoding*” (código de barras do DNA). Um exemplo prático foi obtido analisando 650 pb do gene COI de 200 indivíduos de várias espécies Lepitodoptera. Os dados obtidos permitiram a discriminação de espécies proximamente relacionadas, pertencentes a um grupo considerado com modestas taxas de evolução molecular e alta diversidade (Hebert et al., 2004).

As dificuldades de identificação das espécies de *Atta*, a utilização de um sistema pentanomial de classificação deste gênero no passado (Borgmeier, 1950) e a escassez de taxonomistas especializados neste gênero (Carvalho, 2000) colaboraram para que diversas espécies sofressem várias alterações em sua classificação, o que, conseqüentemente, gerou constantes alterações nas coleções de referência e confusões no reconhecimento das espécies. Neste caso, a utilização de seqüências do gene COI mostra enorme potencial para resolver o limite entre espécies do gênero *Atta*.

A análise dos dados da seqüência do gene da citocromo oxidase I entre as populações de *A. cephalotes* utilizadas neste estudo sugere a presença de dois grupos evolucionários distintos. Espécimes de *A. cephalotes* coletados na região nordeste brasileira formam um clado com forte suporte pelo bootstrap (99%). Também, os espécimes da região amazônica e Nicarágua constituem um outro clado distinto (86%). Este último clado foi composto de quatro haplótipos que são semelhantes entre si, porém bastantes distintos das populações do nordeste (Tabela 2, Figura 3). Apesar do pequeno número de populações que compõem este clado 2 (cinco), as análises das seqüências de COI destas populações indicam a possibilidade da existência de espécies crípticas nas populações de *A. cephalotes* oriundas da região amazônica e América Central.

A divergência encontrada nas seqüências de COI entre os clados 1 e 2 é superior em quase três vezes a divergência observada dentro de cada clado, superando a média (2%) sugerida para diferenciação de espécies neotropicais (Hebert et al., 2004). Essas divergências são suficientes para a construção de “primers” diagnósticos para a distinção dos dois grupos, os quais poderão auxiliar em estudos de estrutura de populações.

De acordo com Juan et al, 1995 e Funk, 1999 uma divergência de 2,3% entre seqüência de mtDNA é alcançada a cada 1 milhão de anos em DNAm de insetos. Já Hebert et al. (2003), adotaram como padrão para a taxa de evolução molecular do gene COI o valor de 3% para cada milhão de anos. Embora este valor sofra as limitações comuns às estimativas baseadas em relógio molecular (Hillis et al, 1996), o valor de divergência encontrado entre os dois clados de *A. cephalotes* (6,5%) indica que o clado 1 divergiu do clado 2 há um período de tempo considerável.

Apesar do claro padrão de divergência encontrado pela análise das seqüências de COI, não é razoável considerar uma árvore baseada em um único gene como evidência suficiente para acreditar na presença de uma espécie críptica (Scheffer, 2000). É possível que a divergência molecular observada na seqüência do gene da COI represente somente polimorfismo intraespecífico em *A. cephalotes*. Entretanto, as características morfológicas analisadas neste trabalho suportam a presença de espécie críptica dentro da espécie nominal.

Os indivíduos do clado 2 são muitos semelhantes aos exemplares de *Atta cephalotes integrrior* redescritos por Gonçalves em sua revisão de 1942, (Gonçalves, 1942) apresentando, assim como os exemplares utilizados por ele, “tufos de pêlos frontais muito fracos, espinhos occipitais reduzidos a tubérculos inconspícuos; espinhos mesonotais anteriores mais curtos que os epinotais”. Ainda que o espécime tipo desta subespécie tenha sido descrito no Pará, o material que Gonçalves observou era oriundo da Bahia. Indivíduos do clado 1 também concordam com a descrição de *A. cephalotes* utilizados nas revisões por Gonçalves, 1942 e Borgmeier, 1950, porém não possuem o vértice e o occipício tão brilhantes (Figura 6A).

Os dados de seqüências de COI e as comparações morfológicas obtidos neste trabalho suportam a hipótese de Carvalho (2000) que observou diferenças significativas entre populações de *A. cephalotes* ao examinar os padrões de bandas

obtidos pela restrição enzimática do DNA da região de ITS e pelo exame de caracteres morfológicos em espécimes oriundos da região amazônica e da Bahia. Considerando que o nível de divergência da sequência da citocromo oxidase I entre os dois clados situa-se dentro da amplitude observada entre outras espécies de insetos-pragas proximamente relacionadas (Scheffer, 2000), a facilidade de distinção dos mesmos por características morfológicas e a diferença em distribuição geográfica, os resultados obtidos indicam uma subestruturação genética dentro de *A. cephalotes*.

Embora as diferenças morfológicas e moleculares encontradas possam ser evidências de uma espécie não descrita dentro de *Atta*, um maior número de exemplares é necessário para confirmar a consistência desses caracteres, tanto para o clado 1 quanto para o 2. Assim, qualquer revisão da atual taxonomia ainda seria prematura porque as observações foram feitas baseadas em número reduzido de operárias máximas (soldados) de cada população estudada.

Devido à falta quase completa de informações sobre as populações da maioria das espécies do gênero *Atta*, hipóteses sobre seu estado de conservação são baseados quase inteiramente no tamanho de sua área de ocorrência e de uma estimativa geral do estado da destruição do bioma das regiões envolvidas. Tais decisões são baseadas também nas classificações taxonômicas existentes que apresentam sérias lacunas, conforme já mencionado anteriormente.

Correa et al. (2005) mostrou claramente uma forte relação da ocorrência de *A. cephalotes* na Bahia com áreas florestais bem conservadas, áreas estas consideradas prioritárias para conservação da Mata Atlântica (MMA, 2002). O fato do nordeste do país ser caracterizado por altos níveis de fragmentação de florestas (Ranta et al., 1998) leva a acreditar que a *A. cephalotes* está sujeita a um drástico declínio populacional nas florestas úmidas da região. Além disso, outra espécie - *A. sexdens*, de conduta de forrageamento mais generalista, vem repetidamente substituindo *A. cephalotes* em fragmentos secundários da Floresta Atlântica no nordeste. Corrêa et al. (2005) ao relatar a ocorrência de *A. cephalotes* no estado de Alagoas verificou o quanto esta espécie é sensível à ação antrópica. Também, ao avaliar 42 remanescentes de floresta Atlântica estes autores verificaram a presença de *A. cephalotes* em apenas sete dos remanescentes estudados. Portanto, a indicação da possível existência de uma espécie críptica em *Atta cephalotes* serve como alerta para a importância do estudo das populações do gênero *Atta*,

principalmente devido às escassas informações sobre distribuição geográfica e abundância dessas populações.

Este estudo representa o ponto inicial para investigações de espécies crípticas deste gênero amplamente distribuído por todo o território nacional. Posteriormente, análises utilizando outros genes e maior número de indivíduos, serão realizados para determinar complementarmente se os clados encontrados neste estudo refletem polimorfismo intraespecífico ou divergência interespecífica, como parece ser o caso.

Finalmente, os dados apresentados neste trabalho evidenciam que o gênero *Atta* necessita de revisão urgente. Para isso, estudos baseados em caracteres morfológicos e moleculares embasados em um maior número de indivíduos de diferentes castas e em novos levantamentos nas áreas de ocorrência seriam importantes. Também, há necessidade que as coleções de referência para estudos com o gênero *Atta* sejam mais bem conservadas e que nestas sejam feitos levantamentos para que, ao início de novos estudos, se possa saber o que existe de material de apoio.

6 CONCLUSÕES

Análise de fragmento da seqüência do gene mitocondrial citocromo oxidase I indica uma subestruturação genética dentro da espécie nominal *Atta cephalotes*.

Variações morfológicas e moleculares sugerem a presença de dois grupos evolucionários distintos em *Atta cephalotes* completamente isolados geograficamente.

Estudos complementares devem ser feitos para melhor elucidar a possibilidade de uma espécie nova dentro do gênero *Atta*.

REFERÊNCIAS

ABREU, J.M. Controle das formigas cortadeiras em plantios de cacau. **Revista Theobroma**, Ilhéus, v.16, n.4, p.199-211, 1986.

ANJOS, N.; MOREIRA, D.D.O.; DELLA LUCIA, T.M.C. Manejo integrado de formigas cortadeiras em reflorestamento, p. 212-241. In: DELLA LUCIA, T.M.C. (Ed.), **As formigas cortadeiras**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1993. 262 p.

AVISE, J. C. Molecular markers, natural history and evolution. In: AMORIM, D. S. **Elementos básicos de sistemática filogenética**. Ribeirão Preto: Hollos Editora. cap.14, p. 188-212, 1997.

AYALA , F. et al. Molecular phylogeny of *Azteca* ants (Hymenoptera, Formicidae) and the colonization of *Cecropia* trees. **Mol. Phylogenet. Evol.** , v. 5, p. 423-428, 1996.

BARCODES OF LIFE: **Barcoding Animal Life**. Disponível em: <http://www.barcodinglife.org/static/Archive_21feb05/static/background/COIProtein.html> Acesso em: 16 de jan. 2006.

BIERRGAARD, R.O.; LOVEJOY, T.E.; KAPOV, V.; SANTOS, A.A.; HUTCHINGS, W. The biological dynamics of tropical rainforest fragments. **Bioscience**, v.42, p. 859-866, 1992.

BOER, P.J. On the survival of populations in a heterogeneous and variable environment. **Oecologia**, v. 50, p. 39-53, 1981.

BOLTON, B. **Identification guide to the ant genera of the world**, Harvard University Press, Cambridge, 1994. 222 p.

BORGMEIER, T. Estudos sobre *Atta* (Hym. Formicidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 48, p. 239-263, 1950.

BORGMEIER, T. Nova contribuição para o conhecimento das formigas neotropicais (Hym. Formicidae). **Revista de Entomologia**, v. 10, n. 2, p. 403-428, 1939.

BORGMEIER, T. Revision der Gattung *Atta* Fabricius (Hymenoptera, Formicidae). **Studia Entomologica**. v. 2, n. 1-4, p. 321-390, 1959.

BRANDÃO, C.R.F.; MAYHÉ-NUNES, A.J. A new fungus-growing ant genus, *Mycetagroicus* gen. n., with the description of three new species and comments on the monophyly of the Attini (Hymenoptera, Formicidae). **Sociobiol.**, v.38, p. 639-650, 2001.

BRANDÃO, C.R.F. Reino Animália: Formicidae. In: JOLY, C.A., CANCELLO, E.M. (ed), **Invertebrados terrestres**. São Paulo: FAPESP, 1999. p. 58-63.
(Biodiversidade do Estado de São Paulo: síntese do conhecimento ao final do século XX, 5).

BROWN, J.R. Diversity of ants. In: AGOSTI, D. et al., (Eds.). **Ants: Standard methods for measuring and monitoring biodiversity**, 2000. p. 280.

BROWN, W.M.; GEORGE, M.JR; WILSON, A.C. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. **Proceeding of the national academy of sciences of the USA**. v. 76, p. 1967-1971, 1979.

BROWN, W.M. Evolution of animal mitochondrial DNA. In: NEI, M. E KOEHN, R.K. (Eds.). **Evolution of genes and proteins**. Sinauer Associates Inc., Massachusetts, p. 62-88, 1985.

CARVALHO, A. O. R. **Análise da variabilidade genética e identificação de espécies do gênero *Atta* (Hymenoptera: Formicidae) por meio de marcadores moleculares**. Curitiba, 2000. 134 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) Área de concentração em Entomologia, Universidade Federal do Paraná.

CARVALHO, A.O.R.; VIEIRA, L.G.E. Determinação das condições ótimas para análise de PCR-RAPD em *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera, Formicidae). **Neotropical Entomology**, v. 30, n. 4, p.593-600, 2001.

CATERINO, M.S.; CHO SOOWON; SPERLING, F.A.H. The current state of insect molecular systematics: A thriving tower of Babel. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 45, p. 1-54, 2000.

CHIOTIS, M.; JERMIIN, L.S.; CROZIER, R.H. A molecular framework for the phylogeny of the ant Subfamily Dolichoderinae. **Mol. Phylogenet. Evol.**, v. 17, p. 108-116. 2000.

CLARY, D.O.; WOLSTENHOLME, D.R. The mitochondrial DNA molecule of *Drosophila yakuba*: Nucleotide sequence, gene organization, and genetic code. **Journal of Molecular Evolution**, v. 22, p. 252–271, 1985.

CORRÊA, M.M. et al. Occurrence of *Atta cephalotes* (L.) (Hymenoptera: Formicidae) in Alagoas, Northeastern Brazil. **Neotropical Entomology**, v. 34, n. 4, p. 695-698, 2005.

DELABIE, J.H. et al. Biogeografia das formigas cortadeiras (Hymenoptera; Formicidae; Myrmicinae; Attini) de importância econômica no leste da Bahia e nas regiões periféricas dos estados vizinhos. **Agropecuária**, v. 9, n. 2, p. 49-58, 1997.

DELLA LUCIA, T.M.C.; FOWLER, H.G.; MOREIRA, D.D.O. Espécie de formigas cortadeiras no Brasil, p. 26-31 In: DELLA LUCIA, T.M.C (Ed.). **As formigas cortadeiras**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. 1993. 262 p.

DOBLER, S.; MULLER, K. Resolving phylogeny at the family level by mitochondrial cytochrome oxidase sequence: phylogeny of carrion beetles (Coleoptera, Silphidae). **Mol. Phylogenet. Evol.**, v. 15, n. 3, p. 309-402, 2000.

EHRLICH, P.R. et al. Extinction, reduction, stability and increase: the response of checkerspot butterflies to the California drought. **Oecologia**, v. 46, p. 101-105, 1980.

FARJI-BRENER, A.G.F.; RUGGIERO, A. Leaf-cutting ants (*Atta* and *Acromyrmex*) inhabiting Argentina: patterns in species richness and geographical range sinze. **J. Biog.** v. 21, p. 391-399, 1994.

FOLMER, O. et al. DNA “primer”s for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. **Mol. Mar. Biol. Biotechnol.**, v. 3. p. 294-299, 1994.

FOWLER, H.G.; DELABIE, J.H.C.; SCHLINDWEIN, M.N. The endemic Brazilian leaf-cutting ants; *Atta silvai* and *Atta robusta* (Hymenoptera: Formicidae): Population status. **Rev. Brás. Entomol.**, v. 40, p. 111-112, 1196.

FOWLER, H.G. Ecologia nutricional de formigas. In PANIZZZI, A.R. e PARRA, J.R.P. (Eds.). **Ecologia Nutricional de Insetos e suas Implantações no Manejo de Pragas**, Ed. Malone LTDA. 1991. 359 p.

FOWLER, H.G. The population status of the endangered Brazilian endemic leaf-cutting ant *Atta robusta* (Hymenoptera: Formicidae). **Biol. Conserv**, v. 74, p. 147-150, 1995.

FUNK, D.J. Molecular systematics of cytochrome oxidase I and 16S from *Neochlamisus* leaf beetles and the importance of sampling. **Mol. Biol. Evol**, v. 16, p. 67-82, 1999.

GONÇALVES, C.R. As formigas cortadeiras da Amazônia, dos gêneros “*Atta*” Fabr. e “*Acromyrmex*” Mayr (Hym. Formicidae). **Atas do Simpósio sobre a Biota Amazônica**, v. 5 (**Zoologia**), p. 181-202, 1967.

GONÇALVES, C. R. Biologia e Ecologia das Saúvas. **Divulgação Agronômica – SHELL**, n. 1, p. 2-11, 1960.

GONÇALVES, C. R. Contribuição para o conhecimento do gênero *Atta* Fabr., das formigas saúvas. **Boletim da Sociedade Brasileira de Agronomia**, v. 5, n. 3, p. 333-358, 1942.

GONÇALVES, C. R. Saúvas do Nordeste do Brasil (*Atta* spp., Formicidae). **Boletim Fitossamitário**, v. 5, n. 1 e 2, p. 1-43, 1951.

HAAVIE, J.; SAETRE, G.-P.; POUM, T. Discrepant in population differentiation at microsatellites, mitochondrial DNA an plumagem colour in the pied flycatchet – inferring evolutionary processes. **Molecular Ecology**, v. 9, p. 1137-1148, 2000.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/ 98/ NT. **Nucleic Acids Symposium**, v. 41, 95-98, 1999.

HARRISON, R.G. Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology. **Tree**, v. 4, p. 6-11, 1989.

HEBERT, P.D.N. et al. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society, Series B**, London, 270 (1512), p. 313–321, 2003.

HEBERT, P.D.N. et al. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly. **PNAS**, v. 101, n. 41, p. 14812-14817, 2004.

HILLIS, D. M.; MABLE, B. K.; MORITZ, C. Applications of molecular systematics: the state of the Peld and a look to the future, pp. 515-543. In HILLES, D.M.; MORITZ, C; MABLE, B. K. (eds.), **Molecular systematics**, 2nd ed. Sinauer, Sunderland, MA. 1996.

HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E.O. **The Ants**. Harvard University Press. 1990. p. 732.

JUAN, C.; OROMI, P.; HEWITT, G.M. Mitochondrial DNA phylogeny and sequential colonization of Canary Islands by darkling beetles of the genus *Pimelia* (Tenebrionidae). **Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.**, v. 261, p. 173-180, 1995.

KEMPF, W. Catálogo abreviado das formigas da Região Neotropical (hymenoptera: Formicidae) **Studia Entomol.** v. 15, p. 3-334, 1972.

KRUSE, J.J. E SPERLING, F.A.H. Molecular phylogeny within and between species of the *Archips argyrospila* complex (Lepidoptera: Tortricidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 94, n. 2, p. 166–173. 2001.

KUMAR, S.; RAMURA, K.; NEI, M. **MEGA: molecular evolutionary genetic analysis**. The Pennsylvania State University, University Park, 1993.

LANDRY, B.; POWELL, J.A.; SPERLING, F.A. Systematics of the *Argyrotaenia franciscana* (Lepidoptera: Tortricidae) species group: Evidence from mitochondrial DNA. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 92, n. 1, 40–46, 1999.

MAJER, J.D. et al. Recolonization by ants bauxite mines rehabilitated by a number of different methods. **Journal of Applied Ecology**, v. 21, n. 1, p. 355-375, 1983.

MARICONI, F.A.M. **As saúvas**. São Paulo, Ed. Agronômica Ceres, 1970. 167 p.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Avaliação e ações prioritárias pra a conservação da biodiversidade da Caatinga, Brasília, Universidade Federal de Pernambuco, **Conservation International do Brasil e Fundação Biodiversitas**. p. 36, 2002.

MORITZ, C.; DOWLING, T.E.; BROWN, W.M. Evolution of animal mitochondrial DNA. Relevance for population biology and systematics. **Ann. Rev. Ecol. Syst.**, v. 18, p. 269-292, 1987.

MYERS, N. The extinction spasm impending: synergisms at work. **Conservation Biology**, v. 1, n. 1, p. 14-21, 1987.

PIETROMNACO, S.F.; HESSLER, R.A.; O'BRIEN, T.W. Evolution of proteins in mammalian cytoplasmic and mitochondrial ribosome. **Journal of Molecular Evolution**, v. 24, p. 110-117, 1986.

POWELL, J.R. et al. Rates of nucleotide substitution in *Drosophila* mitochondrial DNA and nuclear DNA are similar. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 83, p. 9090-9093, 1986.

RAMOS, J.B. **Florestas brasileiras**: a situação da Mata Atlântica e da Floresta Amazônica, 2001. Disponível em: <<http://www.uol.com.br/instagua/info40.htm>> Acesso em: 30 jul. 2005.

RANTA, P. et al. The fragmented Atlantic rain forest of Brazil: Size, shape and distribution of forest fragments. **Biodiver. Conserv**, v. 7, p. 803-817, 1998.

ROSENBERG, D.M.; DANKS, H.V.; LEHMKUHL, D.M. Importance of insectis in environmental impact assessment. **Enviromental Management**, v. 10, n. 6, p. 773-783, 1986.

SAHLS, G.; NYBLOM, K. Philogenetic analysis of the genus *Cheilosia* (Diptera, Syrphidae) using mitochondrial COI sequence data. **Mol. Phylogen. Evol.**, v. 15, p. 235-241, 2000.

SCARPASSA, V.M. et al. Genetic divergence in mitochondrial DNA of *Anopleles nuneztovani* (Diptera, Culicidae) from Brazil and Colombia. **Genetic. Mol. Biol.**, v. 23, p. 71-78, 2000.

SCHEFFER, S. J. Molecular Evidence of Cryptic Species within the *Liriomyza huidobrensis* (Diptera: Agromyzidae). **J. Econ. Entomol.** v. 93, n. 4, p. 1146-1151, 2000.

SCHOEREDER, J.H. Comunidades de formigas: bioindicadores do estresse ambiental em sistemas naturais. In: Congresso Brasileiro de Entomologia, 16, Salvador, 1997. **Resumos**. Salvador: SEB; EMBRAPA-CNPMF, p. 233, 1997.

SCHULTZ, T.R. e MÉIER, R.A phylogenetic analysis of the fungus-growing ants (Hymenoptera: Formicidae: Attini) based on morphological characters of the larvae. **Syst. Entomol.**, v. 20, p. 337-370, 1995.

SHATTUCK, S. O. , Australian ants : their biology and identification . **Monographs on Invertebrate Taxonomy**, vol. 3, p. 9-15, 1999.

SILVA, J.A. **Ecologia**: Mata Atlântica; visão geral, 2001. Disponível em: <http://www.riogrande.com.br/ecologia/mata_atlantica1.htm> . Acesso em: 02 jan. 2006.

SIMMONS, R.B. e SCHEFFER, S.J. Evidence of Cryptic Species Within the Pest *Capitarsia decolora* (Guenée) (Lepidoptera: Noctuidae). **Ann. Entomol. Soc. Am.**, v. 97 n. 4, p. 675-680, 2004.

SIMON, C. et al. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequence and compilation of conserved polymerase chain reation ““primer”s”. **Ann. Entomol. Soc. Am.**, v.87, p. 651-701, 1994.

SOUZA, O.F.; BROWN, V.K. Effects of habitat fragmentation on Amanonian termite communities. **Journal of Tropical Ecology**, v. 10, p. 197-206, 1994.

SUDD, J.H. E FRANKS, N.R. The behavior ecology of ants. **Glasgow: Blackie**, p. 206, 1987.

TURNER, I.M. Species loss in fragment of tropical rain forest: a review of the evidence. **Journal of Applied Ecology**, v. 33, p. 200-209, 1996.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARNÁ. Sistema de Bibliotecas. **Normas para apresentação de documentos científicos**: monografias, dissertações e teses, n. 4. Curitiba, 2003.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARNÁ. Sistema de Bibliotecas. **Normas para apresentação de documentos científicos**: referências, n. 6. Curitiba, 2003.

WEBER, N.A. Gardening ants the attines. **Philadelphia: The American Physiological Society**, p. 147, 1972.

WEBER, N.A. Northern extent of Attine ants (Hymenoptera: Formicidae). **Porc. Entomol. Soc. Wash.**, v. 72, p. 414-415, 1970.

WEBER, N.A. The biology of the fungus-growing ants. New forms. **Rev. Ent.**, v. 7, p. 378-409, 1937

WETTERER et al., Phylogeny of fungus-growing ants (Tribe Attini) based on mtDNA sequence and morphology. **Mol. Phylogent. Evol.**, v. 9, n. 1, p. 42-47, 1998b.

WILCOX, B.A. e MURPHY, D.D. Conservation strategy: the effects of the fragmentation on extinction. **The American Naturalist**, v. 125, p. 879-887, 1985.

WOLSTENHOLME, D.R. Animal mitochondrial DNA: structure and evolving. In: **Mitochondrial Genomes** (eds. D.R. Wolstenholme e K.M. Joen), Academic Press, San Diego, p. 173-216, 1992.

WORLD WILDLIFE FUND – WWF, **Ecossistemas: Mata Atlântica**, 2001. Disponível em : <<http://www.wwf.org.br/wwfec04.htm>>. Acesso em: 30 jul. 2005.